

Die Genfrequenz des Galaktokinase- mangels, bestimmt mit einer einfachen enzymatischen Methode

von

Hilmar Ernst Müller

aus

Schankau



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548407_0014

Aus der Kinderklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. A. Windorfer

Die Genfrequenz des Galaktokinase- mangels, bestimmt mit einer einfachen enzymatischen Methode

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Hilmar Ernst Müller

aus

Schankau

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan :	Prof.Dr.Dr. H. Pauly
Referent :	Prof.Dr. F. C. Sitzmann
Korreferent :	Prof.Dr. A. Windorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.März 1973

Herrn Prof.Dr.med. F. C. S i t z m a n n habe ich für die Überlassung des Themas und seine immer freundliche und prompte wissenschaftliche Beratung sehr zu danken.

Herrn Prof.Dr.med. A. W i n d o r f e r , dem Direktor der Kinderklinik, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Labor.

Herrn Prof.Dr.med. z u r H a u s e n , dem Vorstand des virologischen Institutes, danke ich für die Benutzung des TriCarb Szintillationszählers.

Inhaltsverzeichnis

I. Der Galaktosestoffwechsel	1
1. Vorkommen und Bedeutung	1
2. Abbau der Galaktose	1
II. Enzymopathien im Galaktosestoffwechsel	2
1. GAL-1-PUT-Mangel	2
2. UDP-GAL-4-Epimerase-Mangel	3
3. Galaktokinase-Mangel	3
III. Nachweismethoden des Galaktokinase-Mangels	4
1. Enzymatische Methoden	4
2. Isotopenmethoden (^{14}C -1-Galaktose)	5
IV. Fragestellung und eigene Untersuchungen	6
1. Untersuchungsgut	6
2. Versuchsbeschreibung	7
3. Fehlerquellen	13
4. Diskussion der Methodik	18
V. Eigene Ergebnisse	20
1. Mittelwerte und statistische Berechnungen	20
2. Verteilung der Normalwerte	22
VI. Diskussion (unter besonderer Berücksichtigung der Heterozygotenfrequenz)	27
VII. Zusammenfassung	35
VIII. Literaturverzeichnis	36

I. Der Galaktosestoffwechsel des Menschen

1. Vorkommen und Bedeutung der Galaktose

Die Galaktose ($\alpha_D = +82^\circ$) findet sich hauptsächlich in Verbindung mit Glukose als Milchzucker oder als Laktose im Organismus und als Baustein im Trisaccharid Raffinose, im Tetrasaccharid Stachyose, ferner in zahlreichen Polysacchariden und in den Cerebrosiden (20).

Die Synthese galaktosehaltiger Verbindungen setzt beim Säuger schon früh ein: Ganglioside sind im menschlichen Föten bereits im ersten Monat nachweisbar, Galactocerebroside in Leber und Hirn in der Mitte der Fötalzeit. Intensive Steigerung erfährt die Cerebrosidsynthese unmittelbar nach der Geburt im Zuge der Myelinisierung (5).

Die Galaktose ist somit ein wichtiges Ausgangsprodukt zur Bildung von Glykoproteinen und Glykolipiden. Sie ist auch in der Muttermilch vorhanden. Ein Säugling bezieht rund 1/5 seiner Kalorienmenge aus dem Galaktoseabbau (10).

2. Abbau der Galaktose

Die Erforschung des Abbaufweges exogen aufgenommener Galaktose beim Menschen ist ein Verdienst von Leloir (19) und Kalckar (13).

Eine Übersicht soll die ablaufenden Reaktionen kurz schildern:

1. Gal + ATP $\xrightarrow{\text{Galaktokinase}}$ Gal-1-P + ADP
2. Gal-1-P + UDP-Gluc $\xrightarrow{\text{Gal-1-PUT}}$ Gluc-1-P + UDP-Gal
3. UDP-Gal $\xrightarrow{\text{UDP-Gal-4-Epimerase}}$ UDP-Gluc
4. UDP-Gluc + PP $\xrightarrow{\text{UDPG-Pyro-Phosphorylase}}$ Gluc-1-P + UTP

Erläuterungen:

ADP, ATP	= Adenosindi-, triphosphat
GAL, Gluc	= Galaktose, Glukose
GAL-1-P, Gluc-1-P	= Galaktose-, Glukose-1-Phosphat
PP	= Pyrophosphat (anorganisch)
UDP-Gluc, UDP-GAL	= Uridindiphosphatglukose, -galaktose
UTP	= Uridintriphosphat

II. Enzymopathien im Galaktosestoffwechsel

Wie aus der Übersicht (s.S.1) zu ersehen ist, wirken beim Galaktosestoffwechsel vier Enzyme mit, nämlich die Galaktokinase (E.C.2.7.1.6.), die GAL-1-Phosphaturidyltransferase, (E.C.2.7.7.12.), die UDP-GAL-4-Epimerase (E.C.5.1.3.2.) und die UDPG-Pyrophosphorylase (E.C.2.7.7.9.). Fehlt eines dieser Enzyme, so treten Stoffwechselstörungen auf, da sich Stoffwechselprodukte, die normalerweise nur in geringen Konzentrationen auftreten, anhäufen und somit toxisch wirken.

Die häufigste und bekannteste dieser Enzymopathien, die GALAKTOSÄMIE, wurde 1908 von Reuss (26) beschrieben. Die Folgen dieses Enzymdefektes wirken sich erst dann nachteilig auf den Säugling aus, wenn er Galaktose, bedingt durch die Muttermilch, zu sich nimmt und abbauen soll. Die ersten Symptome treten in ihrer Graduierung fast direkt proportional zur Milchernährung auf (2). Die Galaktose wird durch das Enzym Galaktokinase zu GAL-1-P umgebaut. Das Enzym, das GAL-1-P weiter abbauen soll, fehlt und deshalb wird GAL-1-P bzw. Galaktose zu dem toxisch wirkenden Galaktitol umgebaut und dieses schädigt vor allem Gehirn, Leber und Linse (12).

GAL-1-P soll auch das Enzym Phosphoglucomutase hemmen, weshalb Hypoglykämien auftreten können. Inwieweit diese mitverantwortlich sind für cerebrale Schäden, ist noch fraglich (15).

Der Säugling gedeiht schlecht, er entleert durchfällige Stühle und erbricht, Leber und Milz sind vergrößert, der Ikterus nimmt zu, und cerebrale Krämpfe führen häufig schon in der zweiten Lebenswoche zum Tod.

Von Gitzelmann (10) wurde kürzlich der erste Fall eines UDP-GAL-4-EPIMERASE-MANGELS veröffentlicht. Bei einer Routineuntersuchung wurde bei einem 5 Tage alten Mädchen eine erhöhte Konzentration von GAL-1-P im Blut festgestellt. Die GAL-1-PUT und die Galaktokinase waren normal aktiv, jedoch ließ sich keine UDP-GAL-4-Epimeraseaktivität nachweisen. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung der UDP-GAL in die UDP-Gluc. Von größter Bedeutung ist die UDP-GAL-4-Epimerase bei der Galaktosämie und bei dem Galaktokinasemangel. Hier bildet sie, da die Kranken galaktosefrei ernährt werden, aus UDP-Gluc die für die Glykoproteine und Glykolipide wichtige UDP-GAL.

Bis zu einem Alter von 11 Wochen hatte sich das Kind völlig normal entwickelt, insbesondere zeigten sich keine Lebervergrößerung, keine EEG-Veränderung und keine Katarakt.

Gitzelmann (7) berichtete 1965 über einen anderen Enzymdefekt. Er hatte bei einem 43-jährigen Zigeuner einen GALAKTO-KINASEMANGEL festgestellt. Im Gegensatz zur Galaktosämie bleibt der Galaktokinasemangel beim Säugling ohne bedrohliche Symptome und daher unerkannt.

Bei einem Säugling sollte eine ungeklärte Hyperbilirubinämie, Leber- und Milzvergrößerung, Galaktosurie und pos. Guthrie-Test nicht nur an eine Galaktosämie, sondern auch an den Galaktokinasemangel denken lassen(16).

Die Erkenntnisse über die Auswirkungen des Galaktokinase-mangels über längere Zeit sind noch gering. Die schwerste Komplikation scheint jedoch in der Kataraktbildung zu bestehen. Wenn gezielt danach gesucht wird, kann man Katarakte schon im Alter von wenigen Wochen durch Spaltlampenuntersuchungen nachweisen. Diese können sich jedoch zurückbilden, wenn rechtzeitig mit einer galaktosefreien Diät begonnen wird (17).

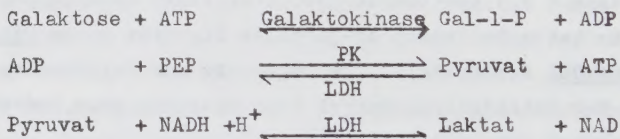
III. Nachweismethoden des Galaktokinasedefektes

Die bisher bekannten Methoden beruhen im wesentlichen auf Radioisotopenmessungen oder auf enzymatische Tests (gekoppelte Reaktionen). Die bisher bekannten Methoden wurden von vielen Autoren variiert; hier seien einige genannt:

1. Enzymatische Methoden mit Bestimmung der Galaktokinasekonzentration im optischen Test.

a. Methode nach Kaloud-Sitzmann (15)

Die Reaktion läuft nach folgender Gleichung ab:



PK = Pyruvatkinase

LDH = Laktatdehydrogenase

PEP = Phosphoenolpyruvat

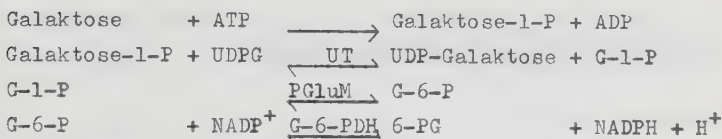
NADH = reduz. Nicotinamid-adenin-dinucleotid

NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid

Die Berechnung der U/gHb erfolgt nach der bekannten Formel für kinetische Tests unter Anwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für NAD bzw. NADH.

b. Methode nach Kraus-Mönch (18)

Die Reaktion läuft nach folgender Gleichung ab:



Diese Reaktion wird gestartet durch Zugabe von Galaktose, die zeitliche Zunahme der NADPH-Extinktion ist der Aktivität der Galaktokinase direkt proportional.

c. Methode nach Gesche-Menne (6)

Galaktose wird durch die Galaktokinase phosphoryliert. Die restliche nichtphosphorylierte Galaktose wird unmittelbar mit der Galaktosedehydrogenase bestimmt.

2. Isotopenmethoden

a. Die überwiegende Zahl der Autoren benutzt diese Methode in vielen Variationen. Eine Literaturübersicht findet man bei Beutler (1). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß reine ^{14}C -1-Galaktose mit Hämolystat, d.h. mit Galaktokinase versetzt wird. Es entsteht dadurch aus der ^{14}C -1-Galaktose das ^{14}C -1-Galaktose-1-Phosphat. Die Auftrennung der phosphorylierten Galaktosederivate und der nicht abgebauten Galaktose erfolgt chromatographisch.

b. Methode nach Beutler (1)

Die Auftrennung erfolgt hier nicht durch Chromatographie,

sondern aus einem Spezialfilterpapier (Austauscherpapier Whatman DE 81) werden alle radioaktiven Substanzen, außer ^{14}C -1-Galaktose-1-Phosphat durch aqua bidest. ausgewaschen.

Die Galaktokinaseaktivität bei den vorliegenden Untersuchungen wurde nach dieser Methode bestimmt.

IV. Eigene Untersuchungen und Fragestellung

Fragestellung:

Nachdem in früheren Untersuchungen diese Methode bereits erprobt worden war, konnte sie nun mit der Frage der Normalwerte bei Kindern verschiedenen Alters angewandt werden. Hierbei sollte auch die Genfrequenz des Galaktokinasedefektes im Einzugsgebiet der Universitäts-Kinderklinik Erlangen festgestellt werden. Hierzu wurden gesunde Kinder, die zu einer Untersuchung in die Poliklinik gebracht wurden, erfaßt. Cerebral geschädigte Kinder oder solche mit Stoffwechselleiden wurden ausgeschlossen, ebenso Kinder mit Augenleiden. Außerdem sollten alle möglichen Fehlerquellen dieser Methode genau festgestellt werden, um sie auch im Routinelabor vornehmen zu können und gut reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

1. Untersuchungsgut

Das Blut wurde gesunden Kindern entnommen, die in der Poliklinik vorgestellt wurden.

Einen großen Teil des Blutes von Früh- und reifen Neugeborenen erhielten wir zur Erstellung der Normalwerte aus der Kinderklinik Graz. Die Werte wurden für die Genfrequenzbestimmung nicht berücksichtigt.

Insgesamt wurden 808 Säuglinge, Kleinkinder und Schulkinder erfaßt.

Altersverteilung

Alter	Frühgeborene	Reife Neugeborene	Säuglinge
Anzahl	41	75	21

Alter (J)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Anzahl	22	19	26	53	65	55	63	81	36	85	22	43	22

Alter (J)	14	15	16 u. älter
Anzahl	28	7	44

Tab.1

2. Versuchsbeschreibung

In ein Reagenzglas mit 0.5 ml ACD-Stabilisator und 0.1 ml 20 mM Glukose werden 2 ml Venenblut gegeben. Das Blut wird bei 2500 U/min 10 Minuten zentrifugiert, das Plasma abgesaugt, die verbleibenden Erythrozyten zweimal mit 10 ml 0.9% NaCl gewaschen und 10 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Der NaCl-Überstand mit Leukozyten und Thrombocyten wird abgesaugt; 0.1 ml der gepackten Erythrocyten werden für die Hämolyse zu 0.4 ml 7 mM β -Mercaptoäthanol in ein Mikrogefäß pipettiert. Um die Hämolyse zu beschleunigen, wird das Mikrogefäß 3 Minuten in einen Rotationsmischer gestellt (am Arbeitsplatz Eppendorf-Einbaueinheit, bestehend aus: Thermostat, Rotationsmischer, Mikrozentrifuge und einen Satz Mikropipetten). Anschließend stellt man das Hämolysat 10 Minuten in die Tiefkühltruhe. Im Rotationsmischer wird das Hämolysat wieder langsam aufgetaut und in der Mikro-

zentrifuge 2 Minuten zentrifugiert.

Zur Hämoglobinbestimmung werden 50 µL Hämolysat zu 10 mL Transformationslösung (Biochemica Test Kombination, 15927) gegeben, und am Eppendorf-Photometer die Extinktion bei 546 nm gegen diese Lösung gemessen (d=1. cm).

Die Eichkurve für die Hb-Bestimmung wurde mit der Cyanmethämoglobin-Standard-Lösung (Fa.Hycel, Cat No 117) erstellt, indem mit dieser Standardlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Messung anhand der Vorschrift der Biochemica-Testmethode vorgenommen wurde.

Verdünnungsreihe: Tab.2 und Abb.1

Hycel-Standard in ml	20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	2.5
Biochemica Testlsg.in ml	00.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5
Extinktion	0.48	0.406	0.361	0.303	0.233	0.186	0.122	0.065

Aus dem Quotienten Konzentration/Extinktion erhält man den Faktor: $F_{Hb} = 41.8$

Die Konzentration des Hämolysates in g% ergibt sich aus der Formel:

$$Hb = F_{Hb} \times OD_{546} \times \frac{0.02}{0.05} \times \frac{10 + V_{Hb}}{10}$$

V_{Hb} = Volumen des Hämolysates, das zur Hb-Bestimmung genommen wird (ml)

OD_{546} = Extinktion der Probe

$$Hb = OD_{546} \times 41.8 \times \frac{0.02}{0.05} \times \frac{10 + 0.05}{10}$$

$$Hb (g/100 ml) = OD_{546} \times 16.804$$

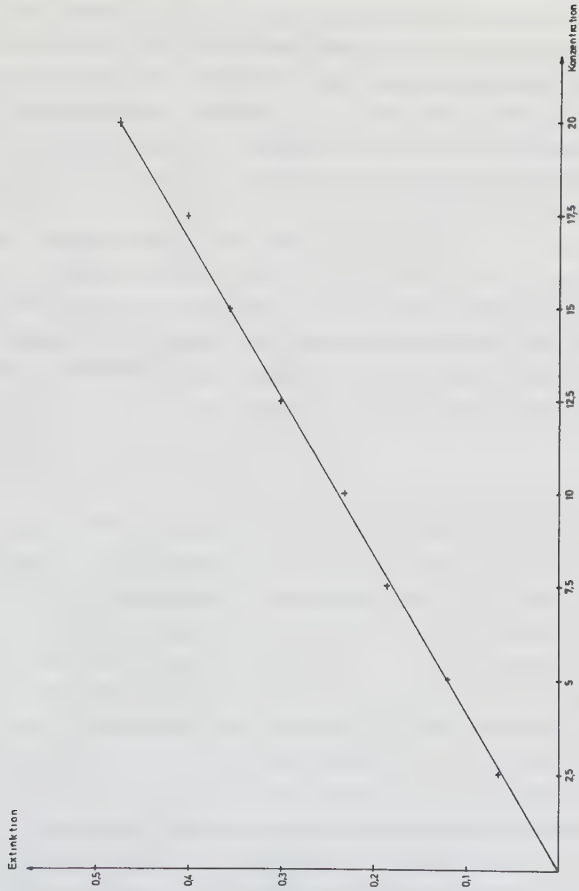


Abb. 1

Bestimmung des Hb - Faktors

$$F_{\text{Hb}} = 41.8$$

Galaktokinasebestimmung

Die radioaktive D-Galaktose-1-¹⁴C (1.3 mg; 0.05 mC) wurde von New England Nuclear bezogen. Diese 1.3 mg Galaktose wurden mit 5.0 ml aqua bidest. aufgelöst. 1 ml dieser Lösung mit einer Radioaktivität von 10 μ C/ml wurde mit 4 ml aqua bidest. verdünnt, so daß sich eine Radioaktivität von 2 μ C/ml ergab. Beide Lösungen (10 μ C/ml und 2 μ C/ml) wurden tiefgefroren aufbewahrt.

Das für die Galaktokinasebestimmung benötigte Reaktionsgemisch wird einmal in größerer Menge angesetzt (hier jeweils für 100 Proben), und vier Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wird das Reaktionsgemisch zu je 1 ml aufgeteilt und tiefgefroren aufbewahrt. Vor jeder Galaktokinasebestimmung wird das Reaktionsgemisch aufgetaut und in Mikrogefäße zu je 100 μ L pipettiert.

Das Reaktionsgemisch enthält:			
NaF	100 mM		100 μ L
MgCl ₂	100 mM		100 μ L
Tris-HCl	1.0 M	pH 7.4	400 μ L
Galaktose	7.6 mM		100 μ L
¹⁴ C-Galaktose		2 μ C/ml	200 μ L
ATP	0.12 M	pH 7.0	100 μ L

Das HämolySAT (nach der oben beschriebenen Methode hergestellt) wird erneut zentrifugiert, 100 μ L davon werden zu 100 μ L Reaktionsgemisch pipettiert, und von den nun erhaltenen 200 μ L werden 100 μ L zu 40 μ L 1 Mol Galaktose pipettiert. Die restlichen 100 μ L, bestehend aus HämolySAT und Reaktionsgemisch, werden bei 37°C eine Stunde inkubiert. Aus den Mikrogefäßen mit 140 μ L Inhalt werden zweimal 50 μ L entnommen und auf Whatman DE 81 Filterblättchen pipettiert, die kurz vorher auf gepreßten CO₂-Schnee gelegt wurden.

Der CO₂-Schnee wird aus einer handelsüblichen CO₂-Flasche mit Steigrohr und Zerstäuber gewonnen.

Die 50 µL (bestehend aus Reaktionsgemisch, Hämolytat und 1 Mol Galaktose) werden fast punktförmig auf die Filterblättchen aufgetragen und frieren schnell ein. Die Blättchen werden dann auf eine Mikrofiltrationsanlage (Fa. Sartorius, SM 16 306) gelegt und mit 600 ccm aqua bidest. gewaschen. Der Sog der Wasserstrahlpumpe wird so reguliert, daß dieses Volumen die Blättchen in ca 4,5 Minuten durchläuft ("A₀-Blättchen"). Der Filter wird vor Auflegen eines neuen Blättchen mit aqua bidest. gespült.

Das zweite Blättchen wird ungefiltert zum Trocknen (ca. 18 Stunden bei Zimmertemperatur) mit einer Stecknadel auf eine Styroporplatte gesteckt ("A₁₀₀-Blättchen").

Das A₀-Blättchen wird nach dem Filtrieren auf eine andere Styroporplatte gesteckt.

Nach 60 Minuten wird das Gemisch aus dem Inkubator genommen, kurz geschüttelt, auf ein Blättchen aufgetragen, mit der gleichen Menge aqua bidest. und der gleichen Durchlaufgeschwindigkeit filtriert und auf eine weitere Styroporplatte gesteckt ("A₆₀-Blättchen").

Die Blättchen stehen über Nacht zum Trocknen bei Zimmertemperatur und werden am nächsten Morgen in Vials gelegt, die noch mit 10 ml Szintillationslösung aufgefüllt werden. Diese Lösung besteht aus 1 l Toluol + 4 g Omnifluor (Fa. New England Nuclear). Gemessen wurde mit einem PACKARD TriCarb, Liquid Scintillation Spectrometer Model 33 80.

Die Galaktokinaseaktivität kann man dann nach folgender Formel errechnen:

$$U = \frac{(A_{60} - A_0) \times 100 \times C}{(A_{100} - bg)} \times \frac{1}{Hb \times T \times 0.5}$$

A_{60} = Radioaktivität der Probe nach 60 Minuten

A_0 = Radioaktivität der Probe zur Zeit Null (=Leerwert)

A_{100} = Radioaktivität des 100 % Standardwertes

bg = radioaktiver background

C = Konzentration der Galaktose im Ansatz

T = Inkubationszeit, hier 60 Minuten

Faktor 100 : g% = g/100 ; g% x 100 = g/ml

Faktor 0.5 : Hämolyse war mit 100 μ l Reaktionsgemisch verdünnt

Faktor C :

$$C = C_1 + \frac{R}{S}$$

C_1 = Konz. der nichtradioaktiven Galaktose μ M/ml

S = spez. Radioaktivität der radioaktiven Galaktose in μ C/ μ M

R = Radioaktivität im Ansatz, hier 0.2 μ C/ml

U = Units; mU = milli-Units = 1/1000 U

$$U = \frac{(A_{60} - A_0) \times 100 \times C}{(A_{100} - bg)} \times \frac{1}{Hb \times 60 \times 0.5}$$

$$C = C_1 + \frac{R}{S} = 0.38 + \frac{0.2}{7.3} = 0.4074 \frac{\mu\text{Mol}}{\text{ml}}$$

$$\frac{A_{60} - A_0}{A_{100} - bg} = A ; bg = 30 ; \left. \begin{matrix} A_{100} \\ A_{60} \\ A_0 \end{matrix} \right\} \begin{matrix} \text{Werte aus dem TriCarb,} \\ \text{ausgedrückt mit Zähldauer} \end{matrix}$$

$$mU = \frac{A}{Hb} \times 0.4074 \times 10^5 \times \frac{1}{30} = \frac{A}{Hb} \times 1358$$

$$mU/gHb = \frac{A}{Hb} \times 1358$$

3. Fehlerquellen

a. Gewinnung des Hämolysates

Die gepackten Erythrozyten wurden während der gesamten Versuchsperiode mit den gleichen Pipetten zu 0.2 ml aufgezogen. Das mundnahe Ende der Pipette wurde mit dem Finger verschlossen, die Pipette gedreht und die Pipettenspitze gereinigt. Die Erythrozyten wurden in die Mercaptoäthanollösung ausgeblasen. Um die an der Lumenwand haftenden Erythrozyten nicht zu verlieren, wurde dreimal mit Mercaptoäthanol nachgespült.

Die Erythrozyten- bzw. die NaCl-Lösung wurde regelmäßig mit der gleichen Umdrehungszahl zentrifugiert. Höhere Rotationsgeschwindigkeiten ergaben höhere Hb-Werte.

b. Hb-Bestimmung

Das Hämolysat wurde vorher in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Mit Mikropipetten (Hubpipetten) werden 50 µL entnommen; dabei taucht die Pipettenspitze in die Mitte des Mikrogefäßes eben ein. Taucht die Spitze zu tief ein, so werden Gewebspartikel (Zellstroma) mit angesaugt und beim Photometrieren ergeben sich fälschlich hohe Werte. Die Pipettenspitze wird sorgfältig gereinigt und in der 10 ml Drabkin-Lösung ausgeblasen. Ansaugen und Ausblasen wird dreimal wiederholt. Das Reagenzglas wird zur besseren Durchmischung dreimal gekippt und muß mindestens 15 Minuten stehen bleiben ehe gemessen werden kann.

c. Ansetzen des Reaktionsgemisches

Die meisten Reagenzien wurden tiefgefroren aufbewahrt (NaF, Galaktose 7.6mM, ^{14}C -Galaktose, ATP). Das Auftauen erfolgte bei Zimmertemperatur. Nach Erreichen der Umgebungstemperatur muß gründlich geschüttelt werden, dies gilt besonders für die ^{14}C -Galaktose. Bei unserem Arbeitsrhythmus wurden stets 10 ml Reaktionsgemisch angesetzt und auf Mikrogefäße zu 1 ml verteilt, diese Menge reichte für ca 100 Proben,

die in einem Zeitraum von 14 Tagen aufgearbeitet wurden. Einerseits erbringen große Volumina an Reaktionsgemisch Proben mit gleicher Radioaktivitätsmenge, andererseits sollte aber das Reaktionsgemisch nicht zu lange stehen und zu oft eingefroren und wieder aufgetaut werden.

d. Gemischherstellung (bestehend aus 100 μ L Reaktionsgemisch und 100 μ L Hämolytat)

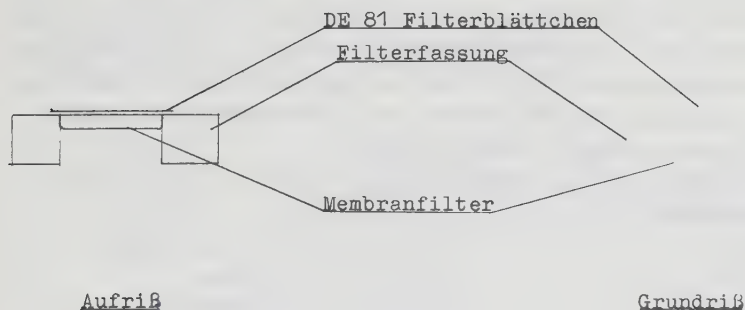
Das Hämolytat wird zwei Minuten zentrifugiert, es werden 100 μ L entnommen und zu 100 μ L Reaktionsgemisch pipettiert, nachdem die Pipettenspitze gereinigt worden war. Sobald das Hämolytat zum Reaktionsgemisch pipettiert wird, beginnt die Reaktion abzulaufen; alle folgenden Schritte müssen daher vorbereitet sein.

Im Rüttler wird das Gemisch zwei Sekunden gerüttelt, mit der gleichen Mikropipette werden 100 μ L zu vorbereiteten 40 μ L 1 M Galaktose pipettiert. Die restlichen 100 μ L werden sofort inkubiert. Das Gemisch aus 100 μ L und 40 μ L 1 M Galaktose wird gerüttelt, die Mikropipette wird ausgetauscht, die Pipettenspitze bleibt. Das Rütteln ist wichtig, da durch das Mischen mit 1 M Galaktose das Anlaufen der Reaktion im Mikrogefäß größtenteils verhindert wird.

e. Auftragen von 50 μ L auf die DE 81 Filterblättchen

Die Lösung wird langsam auf das Blättchen, das auf CO_2 -Schnee liegt, aufgetragen. Sie breitet sich nicht weiter als 3-4 mm im Durchmesser aus. Fließt das Gemisch auseinander, wenn die Blättchen zu lange auf dem CO_2 -Schnee gelegen haben, so gelangt Radioaktivität an den Rand des Filterblättchens. Da das Filterblättchen einen größeren Durchmesser hat als der Filter selbst, würde ein Teil der Radioaktivität an dieser Stelle nicht ausgewaschen und es ergäben sich fälschlich hohe Werte.

Sartorius Membranfilter



f. Filtrieren

Es wurde mit 600 ccm aqua bidest. in einer Zeit von 4,5 Minuten gespült. Das Wasser hatte Zimmertemperatur. Es wurde einmal mit heißem aqua bidest. gespült, dabei lag die Radioaktivität auf dem A_{60} -Blättchen deutlich unter dem Durchschnitt, entsprechend ergaben sich niedrigere Galaktokinasewerte. Sog. entmineralisiertes Wasser war zum Filtrieren ungeeignet. Flammenphotometrisch wurden Na und K in der gleichen Konzentration wie im Leitungswasser nachgewiesen. Die Radioaktivität auf den A_{60} -Blättchen war praktisch gleich der auf den A_0 -Blättchen, d.h. es ergaben sich Galaktokinaseaktivitäten zwischen 0-5 mU/gHb.

Die Zeitdauer der Filtrierung wurde deshalb begrenzt, da durch eine leistungsfähigere Wasserstrahlpumpe ein größerer Sog entsteht und mehr Radioaktivität aus dem Blättchen gespült werden kann.

Das Auftragen des Gemisches ohne CO_2 -Schnee, sondern durch schnelles Eintrocknen mit einem Föhn wurde für kurze Zeit versucht, es ergaben sich jedoch zu hohe Werte, da das Gemisch immer bis zum Rande des Filterblättchens vordrang.

g.Szintillationszählung

Es wird eine Zähldauer im Szintillationszähler von mindestens 20 Minuten empfohlen. Je höher die Zähldauer, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß pro Zeiteinheit alle Zerfälle registriert wurden. Diese Zähldauer konnte bei unseren Versuchen nur selten eingehalten werden. Die meisten Proben wurden zwischen einer und zwei Minuten gezählt. Der durch die Verkürzung der Zähldauer auftretende Fehler ist gering. Dies sollen folgende Versuche zeigen:

16 beliebige Proben wurden am gleichen Tag 1 und 10 Minuten gemessen:

1 Minute		10 Minuten
27.67 mU/gHb		29.27 mU/gHb
39.17		37.09
16.91		15.90
21.97		20.81
16.68		16.31
27.20		27.89
18.79		20.22
27.08		27.15
28.87		27.93
26.27		29.70
35.72		34.82
58.76		62.45
20.49		19.55
28.32		29.86
28.48		27.65
<u>20.43</u>		<u>22.94</u>
27.68	Mittelwert	28.10
<u>+10.39</u>	Standardabw.	<u>+11.01</u>
37.54	Variationskoeff.	39.18

An 16 anderen Proben wurden die gleichen Untersuchungen vorgenommen:

24.73 mU/gHb	24.07 mU/gHb
<u>+6.16</u>	<u>+5.77</u>

Werden die vom TriCarb ausgedruckten Counts pro Minute miteinander verglichen, so fällt auf, daß besonders die A_{60} -Werte größeren Schwankungen unterliegen als zum Beispiel die A_0 - oder die A_{100} -Werte.

Die Mittelwerte von 50 beliebigen A_{100} -Werten und den entsprechenden A_0 - und A_{60} -Werten mit Variationskoeffizienten sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

A_0 :	60.65 $\pm$ 13.02 CPM	VK = 21.47
A_{60} :	598.20 $\pm$ 193.73 CPM	VK = 32.40
A_{100} :	8852.02 $\pm$ 532.0 CPM	VK = 6.01

Tab.3

Beutler (1) weist auf den Quench-Effekt beim Auszählen von radioaktiven Substanzen in Hämolysaten hin. Würden die Schwankungen des A_{60} -wertes jedoch auf den Quench-Effekt allein zurückgehen, so müßten sich zumindest ebenso große Schwankungen beim A_{100} -Wert zeigen, da dieser nicht gefiltert wird.

Um diese große Schwankungsbreite auszuschalten, wurden die A_{60} -Proben nach der Inkubationszeit 5 Minuten in kochendes Wasser gestellt; dadurch wurde erstens das Enzym inaktiviert und zweitens koagulierte das Hämoglobin. Anschließend wurde das Gemisch zweimal zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein anderes Mikrogefäß pipettiert, noch einmal zentrifugiert und davon 50 μ L auf ein DE 81 Filterblättchen aufgetragen.

Die A_{60} -Werte zeigten auch nach dieser Anordnung eine ähnliche Schwankungsbreite wie vorher.

h.Mayes und Guthrie (22) wiesen auf die große Bedeutung des Tris-HCl-Puffers hin. Diese Autoren benutzten ein Reaktionsgemisch wie bei unserem Versuch, nur in anderer Konzentration. Bei einer Änderung des Puffers von pH = 7.0 auf 7.8 verdoppelt sich angeblich die Galaktokinaseaktivität. Der pH-Wert

unseres Puffers lag bei pH =7,4.

- i. Beutler (1) weist auch darauf hin, daß der Quench-Effekt durch Trocknen in einem Brutschrank vergrößert wird, weshalb unsere Proben bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

4. Diskussion der Methodik

Zur Kontrolle der Präzision der Methode und der Enzymstabilität wurden mehrere Versuche unternommen.

a. Präzision in der Serie:

Aus einer Blutprobe wurden mehrmals mehrere Bestimmungen vorgenommen. Es ergaben sich folgende Einzelwerte in mU/gHb:

Kontrolle 1

22.50
23.65
32.21
33.14
33.40
40.31
36.40
41,78
36.51
35.41
33.53
±6.29
18.76

Mittelwert
Standardabw.
Variationskoeff.

Kontrolle 2

32.88
30.12
31.49
37.67
27.92
24.68

30.79
+4.43
14.39

b. Präzision von Tag zu Tag

An verschiedenen Tagen wurde jeweils von der gleichen Person Blut entnommen, dieses wurde noch am gleichen Tag aufgearbeitet.

Es ergaben sich dabei folgende Galaktokinasewerte in mU/gHb:

33.53 mU/gHb

30.79

34.32

29.65

33.15

39.03

26.57

40.90

33.49 Mittelwert

±4.73 Standardabw.

14.12 Variationsk.

c. Blut wurde im Kühlschrank aufbewahrt:

Aktivitätsverhalten

1 Tag : 36.69 Ausgangswert: ~~33.55~~
±5.35 ±5.15

gleichbleibend

1 Woche 26.70 Ausgangswert: 26.00
±6.03 ±5.05

gleichbleibend

d. HämolySAT wurde im Kühlschrank aufbewahrt:

1 Tag : 24.92 Ausgangswert: 33.55 Verlust von 26 %
±3.23

1 Woche 7.65 Ausgangswert: 26.00 Verlust von 70.6 %
±2.27

e. Verhalten von Blut bei Zimmertemperatur mit ACD-Stabilisator, drei Tage gestanden(wichtig für Postversand):

Ø 33.55 Ausgangswert: 30.79 } gleichbleibend
±5.15 ±4.43 }

V. Eigene Ergebnisse

1. Für die verschiedenen Altersklassen ergeben sich folgende Mittelwerte mit Standardabweichungen: Abb. 2 u. Tab. 4

Alter	Frühgeborene	Reife Neugeborene	Säuglinge
Anzahl	40	69	20
Mittelwert	105.55	87.17	32.60
Standardabw.	± 30.92	± 23.11	± 6.85

Alter in J.	1	2	3	4	5	6	7	8
Anzahl	17	17	25	50	62	51	63	79
Mittelwert	33.29	31.82	29.72	31.82	31.98	27.69	27.97	29.19
Standardabw.	± 5.53	± 7.87	± 6.78	± 8.24	± 8.89	± 6.89	± 5.88	± 6.76

Alter in J.	9	10	11	12	13	14	15	16
Anzahl	36	83	22	41	21	28	6	41
Mittelwert	31.22	29.27	28.55	28.17	27.71	27.50	25.17	28.66
Standardabw.	± 8.96	± 6.97	± 7.31	± 6.07	± 7.09	± 6.59	± 3.43	± 7.18

Tab.4 und Abb.2

Insgesamt wurden 808 Säuglinge und Kinder untersucht. In der Altersklasse 16 Jahre sind auch einige Erwachsene aufgenommen worden, ohne daß dies besonders gekennzeichnet wurde.

In der Tabelle beträgt die Gesamtsumme 771.

37 Werte wurden in diese Tabelle nicht aufgenommen.

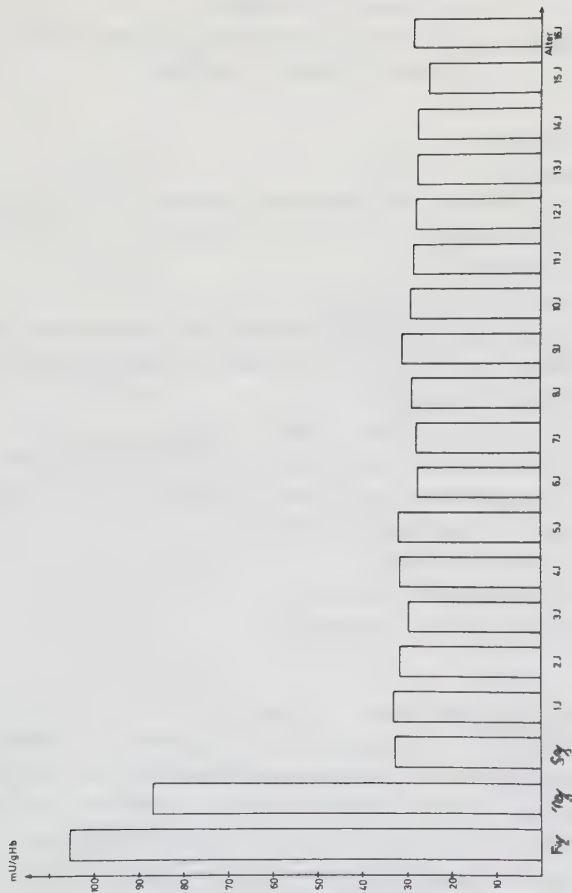


Abb. 2

Mittelwerte der Galaktokinaseaktivität bei verschiedenen Altersgruppen

Fg = Frühgeborene

Ng = Neugeborene

Sg = Säuglinge

- a. Aus der Gruppe der Frühgeborenen 1 Wert unter 55 mU/gHb
- b. Aus der Gruppe der reifen Neugeborenen 3 Werte unter 50 und 3 Werte über 165 mU/gHb
- c. Aus der Gruppe der Säuglinge und älteren Kinder 22 Werte über 49 und 8 Werte unter 15 mU/gHb

2. Histogramme

a. Frühgeborene - Abb.3

Das Blut von 41 Frühgeborenen wurde auf die Galaktokinaseaktivität untersucht und die Ergebnisse in das Histogramm aufgenommen.

b. Reife Neugeborene - Abb.4

Das Blut von 75 reifen Neugeborenen wurde auf die Galaktokinaseaktivität untersucht und die Ergebnisse in das Histogramm aufgenommen.

c. Säuglinge und ältere Kinder - Abb.5

Das Blut von 688 Säuglingen und älteren Kindern wurde auf die Galaktokinaseaktivität untersucht und die Ergebnisse in das Histogramm aufgenommen

662 Werte aus Tab.4

22 Werte über 49 mU/gHb

4 Werte unter 15 mU/gHb
688

3. Kumulative Häufigkeit - Abb.6

Diese wurde in einem Bereich zwischen 15 und 49 Galaktokinaseeinheiten errechnet und graphisch aufgetragen.

Insgesamt wurden dazu 662 Werte verwendet für den Altersbereich der Säuglinge bis zu den 16-jährigen.

Die Kurve zeigt eine Normalverteilung an.

4. Überprüfung auf die Art der Verteilung - Abb.7

Gleiche Anzahl und Altersverteilung wie bei 3. Es wurden jedoch 2 verschiedene Maßstäbe in der Abszisse verwendet. Bei der steileren Geraden wurden jeweils drei Galaktokinasewerte zu einer Klasse zusammengefaßt.

Die flachere berücksichtigt jeden einzelnen Galaktokinasewert.

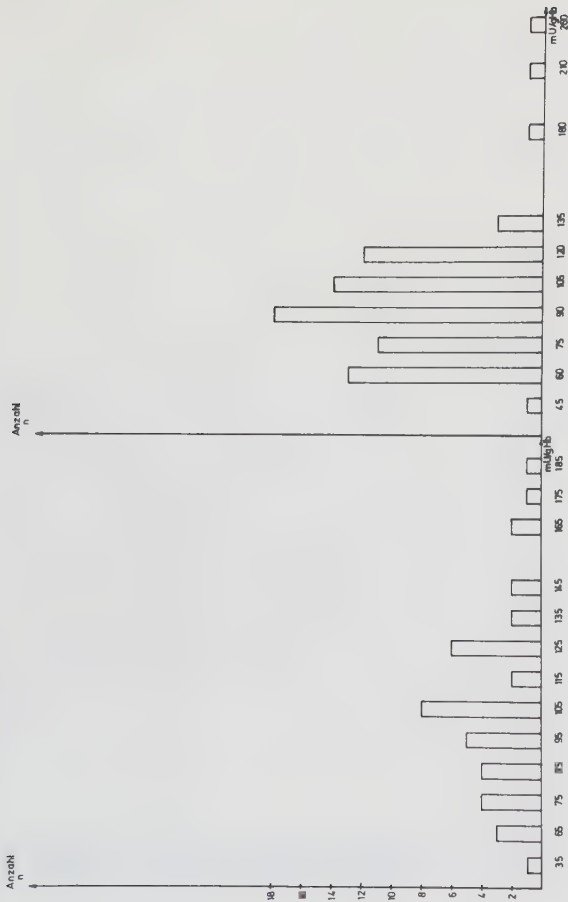


Abb. 3

Histogramm der Frühgeborenen

$M = 105.55 \pm 30.92 \text{ mU/gHb}$

Abb. 4

Histogramm der reifen Neugeborenen

$M = 87.17 \pm 23.11 \text{ mU/gHb}$

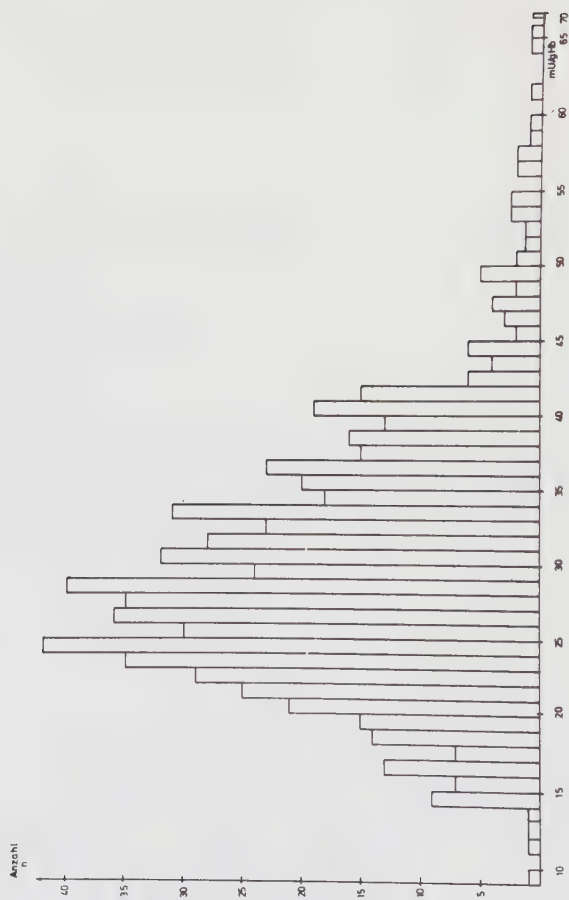


Abb. 5

Histogramm der Säuglinge und älteren Kinder

$M = 29.57 \pm 7.32 \text{ mU/gHb}$

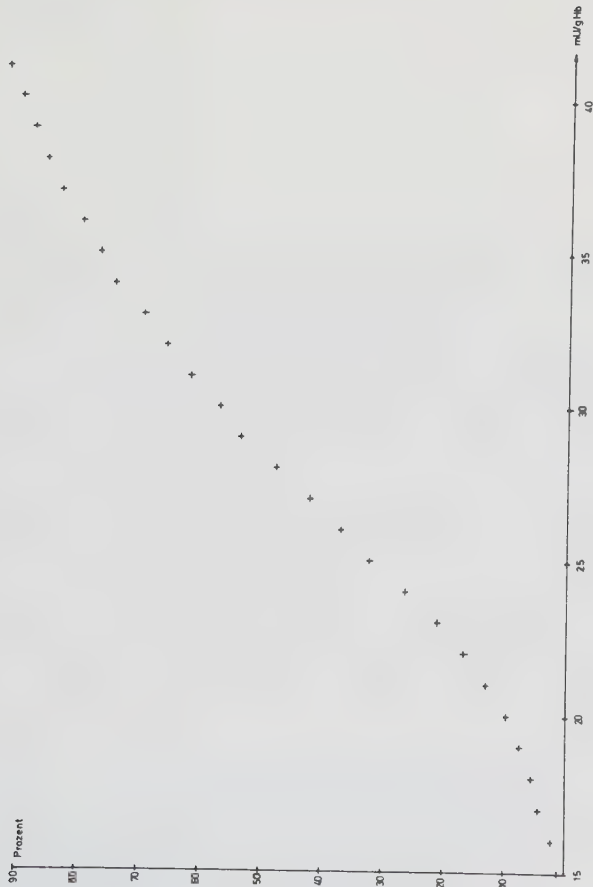


Abb. 6

Darstellung der kumulativen Häufigkeit

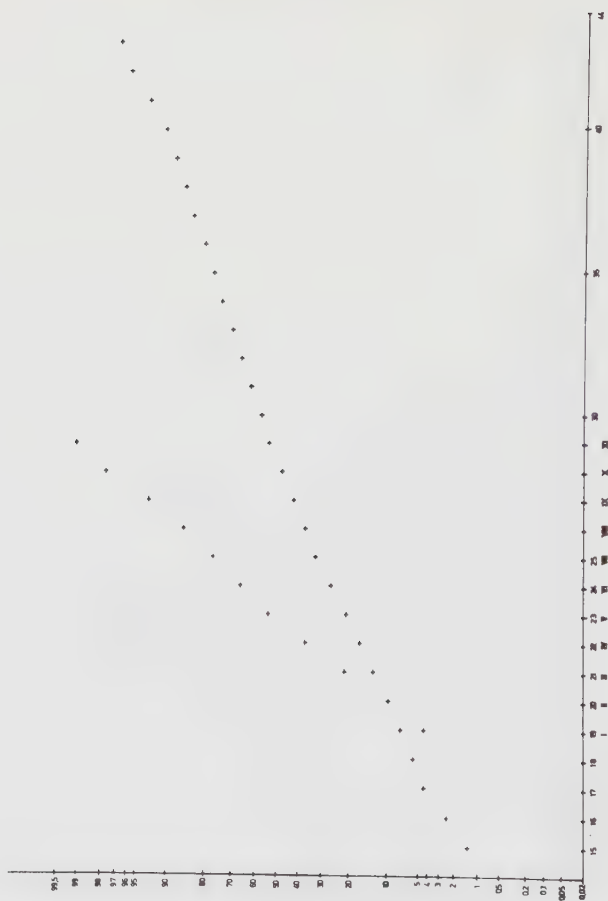


Abb. 7

Überprüfung auf die Art der Verteilung

Abszisse linearer Maßstab

Ordinate logarithmischer Maßstab

Es ergibt sich eine Normalverteilung, da sich eine Gerade abzeichnet (Abszisse linearer Maßstab, Ordinate logarithmischer Maßstab).

VI. Diskussion

Die Galaktosämie stellt die bekannteste Enzymopathie im Galaktosestoffwechsel dar. Bei ihr handelt es sich um ein autosomal-rezessiv vererbtes Stoffwechselleiden, das häufig in den ersten Lebenstagen undiagnostiziert zum Exitus führt (14, 27). Falls der Säugling die ersten 14 Tage dieser Krankheit überlebt, drohen ihm Leberzirrhose, geistige Retardierung und Katarakt.

Von größter Bedeutung ist deshalb eine frühzeitige Diagnose, denn durch eine galaktosefreie Ernährung ist eine normale körperliche und geistige Entwicklung möglich. Ähnlich große Bedeutung wie die frühzeitige Diagnose haben genealogische Untersuchungen. Hauptsächlich Frauen müssen von ihrer Krankheit wissen, da sie in der Schwangerschaft durch galaktosereiche Nahrung den Föten schon intrauterin schädigen können (15).

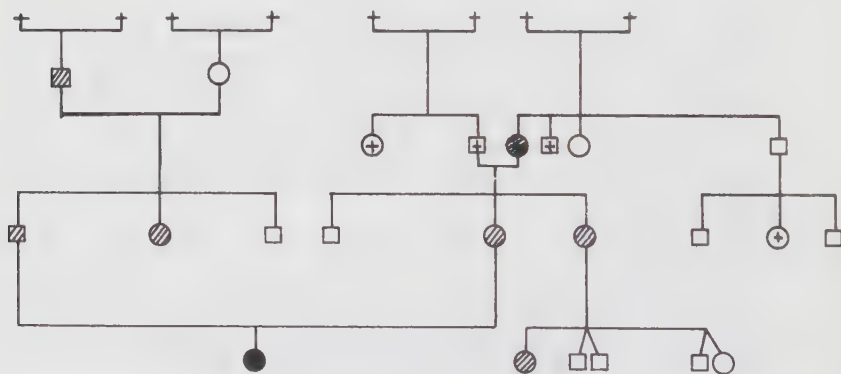
Von Gitzelmann (7) wurde 1965 der Galaktokinase-mangel beschrieben. Im Gegensatz zur Galaktosämie verläuft diese Krankheit nie foudroyant, Leberzirrhose und geistige Retardierung treten nicht auf, das einzige Symptom scheint die Bildung von Katarakten zu sein.

Die Katarakt ist jedoch bei den Säuglingen schwer nachzuweisen und fällt praktisch nie auf. Säuglinge mit dieser Krankheit fallen bei Neugeborenen-Screenings auf, da sie zu hohe Blutgalaktosespiegel oder reduzierende Stoffe im Harn haben (Guthrie-Test). Die Verdachtsdiagnose lautet bei dieser Krankheit fast immer Galaktosämie. Stellt sich jedoch heraus, daß ein Säugling mit Hypergalaktosämie und

Galaktosurie normale GAL-1-PUT Aktivitäten aufweist, so muß so lange galaktosefrei ernährt werden, bis der Ausschluß eines Galaktokinasedefekts gelungen ist (16).

Die meisten Screening-Tests suchen nach erhöhten Blut- oder Urinzucker. Dabei ist jedoch zu beachten, daß z.B. der erhöhte Galaktosespiegel nur kurze Zeit im Blut verbleibt und schnell wieder durch die Nieren ausgeschieden wird. So erklärt sich, daß Guthrie (11) unter 372 000 Neugeborenen keinen einzigen Galaktokinasedefekt entdeckt hat. Thalhammer (29) empfiehlt Blut- und Urinproben immer zu einem bestimmten Zeitpunkt abzunehmen, etwa 1-2 Stunden nach der zweiten Tagesmahlzeit.

In der Literatur sind bis jetzt 11 Fälle von Galaktokinase-mangel beschrieben worden (7, 8, 29, 3, 4, 17, 21, 23, 25, 30). Eine 12. Publikation über einen Galaktokinase-mangel stammt von Kaloud, Sitzmann, Mayer und Paltauf (16). Der Stammbaum dieses Kindes wurde dabei genau erforscht.



Stammbaum der Familie W. mit mehreren heterozygoten Merkmalsträgern und einem Galaktokinase-mangel.

Die Galaktokinaseaktivität dieses homozygoten Kindes, seiner heterozygoten Eltern und Verwandten wurden nach der oben beschriebenen Methode mituntersucht.

Es ergaben sich dabei folgende Aktivitäten:

W. Kind	homozygot	0.98 mU/gHb
W. Mutter	heterozygot	3.48 mU/gHb
W. Vater	heterozygot	4.90 mU/gHb

Diese Methode eignet sich gut, homozygot Kranke von Gesunden zu unterscheiden. Schwierigkeiten bestehen jedoch darin, normale Enzymaktivitäten von um die Hälfte verminderten Werten (=Heterozygote) abzugrenzen.

Aus den 662 Einzelwerten der Säuglinge und älteren Kindern, jedoch ohne die genannten 22 Werte über 49 mU/gHb und ohne die 4 Werte unter 15 mU/gHb, wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet:

$$M = 29.57 \pm 7.32 ; n=662$$

Als fraglich heterozygot werden alle Aktivitäten angesehen, die unter der 2 s - Grenze liegen.

$$29.57 - 14.64 = 14.93$$

Im Histogramm (Abb.5) wird auch eine deutliche Cäsur zwischen 14 und 15 Galaktokinaseaktivitäten sichtbar. Es können deshalb die vier Galaktokinasewerte unter 15 als fragliche Heterozygote angesehen werden.

Insgesamt wurden jedoch 8 Galaktokinasewerte unter 15 mU/gHb gefunden. Drei von den restlichen vier Werten gehören zu der geschilderten Galaktokinasedefekt-Sippe und der 8.Wert stammt ebenfalls von einem Probanden aus Österreich, so daß er als Grundlage für eine Berechnung der Heterozygotenfrequenz hier nicht berücksichtigt werden darf. Die vier fraglichen Heterozygoten aus Österreich wurden aus 35 Blutuntersuchungen herausgefunden; diese Galaktokinasebefunde werden ebenfalls nicht mitberücksichtigt bei der Erstellung der Heterozygotenfrequenz.

Bei den Frühgeborenen ergab sich ein Mittelwert von 105.55 mU/gHb und eine Standardabweichung von ± 30.92 bei einer

Anzahl von $n = 40$. Der Wert 53.0 mU/gHb wurde hier nicht berücksichtigt.

Wird der 2 - s- Bereich berechnet, so ergibt sich:

$$105.55 - 61.84 = 53.71 \text{ mU/gHb}$$

Die Differenz beträgt 53.71 mU/gHb und da der nichtberücksichtigte Wert 53.00 mU/gHb beträgt, bedeutet dies, daß dieser Wert als Heterozygotengrenzwert angesehen werden darf. Sowohl dieser als auch 27 weitere Werte aus dieser Gruppe stammen aus Österreich und können deshalb bei der Erstellung der Heterozygotenfrequenz nicht berücksichtigt werden.

Die gleichen Berechnungen für die reifen Neugeborenen ergeben folgende Ergebnisse:

$$87.17 - 46.22 = 40.95 \text{ mU/gHb}$$

Bei den reifen Neugeborenen lagen drei Werte unter 50 mU/gHb , jedoch über 40.95 mU/gHb und kommen somit als fraglich heterozygot nicht in Betracht. 42 Werte aus dieser Gruppe stammen aus Österreich und diese können deshalb bei der Erstellung der Heterozygotenfrequenz nicht berücksichtigt werden.

Heterozygotenfrequenzberechnung:

Anzahl	Altersgruppe	Heterozygote Merkmalsträger
631	Säuglinge bis 16-jährige	4
12	Frühgeborene	0
27	Reife Neugeborene	0
670		4

Die Heterozygotenfrequenz kann man nach folgender Formel errechnen:

$$2 \times p \times q = \text{Heterozygotenfrequenz}$$

$$p = \frac{2 \times AA + Aa + aa}{2 \times (AA + Aa + aa)}$$

AA = homozygot gesund

p = Genhäufigkeit für A

Aa = heterozygot

q = Genhäufigkeit für a

aa = homozygot krank

p + q = 1

$$p = \frac{2 \times 670 + 4}{2 \times (670 + 4)} = \frac{1344}{1348} = 0.9970326$$

$$q = 1 - p = 1 - 0.9970326 = 0.0029674$$

$$2 \times p \times q = 0.0059171891$$

Die Heterozygotenfrequenz beträgt demnach 0.0059172;

das entspricht einem Verhältnis von 1 : 169.

Die Homozygotenfrequenz beträgt dann 1 : 114 000.

In der Literatur finden sich wenige Hinweise auf ähnliche Untersuchungen. Mayes und Guthrie (22) fanden unter einer Anzahl von 642 Versuchspersonen 6 mit deutlich verminderter Galaktokinaseaktivität. Das entspricht einem Verhältnis von 1 : 107 und einer Homozygotenfrequenz von 1 : 45 000. Dieses Verhältnis wird von einigen Autoren als falsch angesehen.

So hat Cook (3) 42 Kinder und Jugendliche mit Katarakten (14 Mädchen und 28 Jungen im Alter von 3-19 Jahren)

untersucht; ein Galaktokinasedefekt konnte nicht entdeckt werden. Mayes und Guthrie (22) haben selbst 107 Kinder aus einer Blindenschule und vier mit jugendlichen Katarakten untersucht, ohne einen pathologischen Wert zu erhalten. Monteleone (23) hat ebenfalls den Galaktokinasespiegel zahlreicher Kinder überprüft, ohne einen Galaktokinase-mangel zu finden.

Gitzelmann schrieb noch 1967 (8), daß die Kenntnisse über die Hetero- und Homozygotenfrequenz sehr gering seien. Es hat sich seitdem noch nicht allzuviel geändert.

In den 11 beschriebenen Fällen und der im Druck befindlichen 12. Arbeit eines Galaktokinasedefektes weisen alle Autoren darauf hin, daß es sich um ein autosomal-rezessives Erbleiden handelt. Dieses Leiden kommt gehäuft bei Zigeunern und ähnlichen Rassen vor. Darin, und in der Häufigkeit von Konsanguinität und in regionalen Gegebenheiten durften wohl die Hauptursachen für die großen Unterschiede der Homo- und Heterozygotenfrequenz der verschiedenen Autoren liegen.

Mayes und Guthrie (22) untersuchten 642 Personen unterschiedlichen Alters und fanden dabei eine ähnliche Normalverteilung wie geschildert. Die Normogramme stimmen gut überein. Ng et al. (24) stellen fest, daß die Galaktokinaseaktivität bei Neugeborenen dreimal höher liegt als bei Erwachsenen. Die Autoren teilen ihre Altersgruppen in Neugeborene von 24 Stunden, Säuglinge bis zu 12 Monaten und dann in 10 Jahresabstände ein. Dabei ergeben sich doppelt so hohe Werte bei den 12 Monate alten Kindern als sie in dieser Arbeit gefunden wurden. Dies läßt sich dadurch erklären, daß in der 12-Monats-Gruppe Neugeborene von z.B. 10 Tagen mit enthalten sind und diese den Mittelwert daher deutlich ansteigen lassen.

Im Gegensatz zu Ng et al. wurde die Galaktokinaseaktivität der Erwachsenen von Kindern schon im Alter von einem Jahr erreicht, bei den Untersuchungen von Ng dagegen erst mit drei Jahren. Die Autoren untersuchten auch das Aktivitäts-

verhalten der Galaktokinase im Hämolysat und fanden nach einem Tag einen 20 % und nach sechs Tagen einen 90 % Aktivitätsverlust. Diese Werte stimmen fast mit den von uns gefundenen Aktivitätsverlusten von 26 % und 70,6 % überein. Sowohl diese Autoren als auch Pickering (25) stellen fest, daß innerhalb der gleichen Altersgruppe große Schwankungsbreiten auftreten. Pickering vermutet deshalb, daß diese Kinase einer, bis jetzt noch unbekannten, Steuerung unterliegt. Beutler (1) fand mit der gleichen Untersuchungsmethode etwas höhere Werte als in der eigenen Arbeit angegeben sind. Dessen Mittelwert der Galaktokinaseaktivität für Kinder liegt bei 32.25 mU/gHb und für Erwachsene bei 29.33 mU/gHb. Der Wert, den Beutler für Erwachsene ermittelte, ist praktisch mit dem von uns gefundenen für Kinder identisch.

Pickering (25) schlägt vor, statt die Galaktokinaseaktivität allein zu bestimmen, immer die GAL-1-PUT mit zu untersuchen. Der Quotient aus beiden gibt dann weit bessere Auskunft über hetero- und homozygot Kranke als ein Wert allein. So wies ein heterozygoter Merkmalsträger eine Galaktokinaseaktivität von 0.093 μ M/ml/hr auf (normal 0.133) und eine GAL-1-PUT von 3.88 (normal 2.74). Der Quotient beim heterozygot Kranken beträgt 0.024 und beim Gesunden 0.0485. Die Galaktokinaseaktivität unterscheidet sich mit 0.093 und 0.133 weniger deutlich.

Ähnliches schlugen Tedesco und Mellman (28) vor; sie konnten den Genotyp in Fibroblasten gut mit dem umgekehrten Verhältnis bestimmen.

Über schwerwiegende Folgen des Galaktokinasemangels, außer Kataraktbildung, ist nichts bekannt. Es ist jedoch zu bedenken, daß von den 12 publizierten Fällen 4 Personen noch zusätzlich an anderen Krankheiten litten:

Morb.Recklinghausen (7), Diabetes mell. (9), generalisierte Krämpfe (25), Ossifikationsbeschleunigung und leichte EEG-Veränderungen & 16).

Diese Symptome und Erkrankungen stehen wahrscheinlich nicht

in Zusammenhang mit dem Galaktokinasedefekt. Weitere Untersuchungen sind aber hier erforderlich. So sollte bei Diabetikern, Kindern mit Anfallsleiden und solchen mit Ossifikationsbeschleunigung die Galaktokinase noch serienmäßig kontrolliert werden. Auch medikamentöse Einflüsse auf die Galaktokinaseaktivität wären zu prüfen.

Eine befriedigende Erklärung für die deutlich erhöhten Galaktokinasewerte läßt sich schwer finden. Ng et al. (24) weist darauf hin, daß die Galaktokinaseaktivität beim Down Syndrom höher liegt als im Durchschnitt. Ferner haben Blutproben mit erhöhter Retikulozytenzahl eine höhere Galaktokinaseaktivität (1). Beutler ernährte Erwachsene mit reichlich Galaktose und konnte ausschließen, daß dadurch erhöhte Galaktokinasewerte bedingt sind.

Schließlich muß noch die von Pickering vermutete physiologische Steuerung erwähnt werden. Damit verbunden scheint die Frage einer Hyperaktivität dieses Enzyms zu sein.

VII. Zusammenfassung

Zu den Enzymopathien des Galaktosestoffwechsels gehören die Galaktosämie, der Galaktokinase-mangel und der von Gitzelmann (10) 1972, erstmals beschriebene Uridindiphosphat-Galaktose-4-Epimerase-Mangel. Symptome, Diagnose, Therapie dieser Erkrankungen werden kurz skizziert und es wird auf die zahlreichen Nachweismethoden des Galaktokinase-mangels eingegangen.

Das Verhalten der Galaktokinase von 808 Säuglingen und Kindern bis zu 16 Jahren wurde nach der Methode von Beutler (1) untersucht. Dabei wird ^{14}C -Galaktose von der Galaktokinase zu ^{14}C -Galaktose-1-Phosphat abgebaut. Unter Berücksichtigung einer Reihe von Faktoren kann man aus dem Verhältnis von gebildetem ^{14}C -Galaktose-1-Phosphat und nicht umgesetzter ^{14}C -Galaktose auf die Aktivität der Galaktokinase im Hämolysat schließen.

Das Aktivitätsverhalten der Galaktokinase über mehrere Tage, sowohl im Blut, als auch im Hämolysat, wurde untersucht. Im Hämolysat trat ein Aktivitätsverlust auf, im Blut blieb die Aktivität annähernd konstant.

Hohe Galaktokinaseaktivitäten zeigten sich bei den Frühgeborenen (106 mU/gHb) und reifen Neugeborenen (86 mU/gHb) gegenüber Säuglingen (33 mU/gHb) und den übrigen Altersgruppen von 1-16 Jahren (33- 28 mU/gHb).

Aus 662 Einzelwerten (1-16 Jahren) wurde ein Aktivitätsmittelwert von 29.57 ± 7.32 mU/gHb errechnet.

Auf eine Anzahl von Fehlermöglichkeiten im Arbeitsgang wurde auf Grund eigener Erfahrung hingewiesen.

Unter den gefundenen Galaktokinasewerten lagen vier deutlich unter der Norm; diese wurden als heterozygote Merkmalsträger betrachtet.

Daraus konnte für das Einzugsgebiet der Universitäts-Kinder-Klinik Erlangen eine Heterozygotenfrequenz von 1 : 169 und eine Homozygotenfrequenz von 1 : 14 000 errechnet werden.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Beutler, E., N.V. Paniker, F. Trinidad,
The Assay of Red Cell Galactokinase
Biochem. Med., 5, 325, 1971
2. Brandt, N.J.
Frequency of Heterozygotes for Hereditary Galactosemia
in a Normal Population
Acta genet., (Basel), 17, 289, 1967
3. Cook, J.G.H., N.A. Don, T.P. Mann
Hereditary Galactokinase Deficiency
Arch. Dis. Childh. 46, 465, 1971
4. Dahlquist, A., I. Gamstorp, H. Madsen,
A Patient with Hereditary Galactokinase Deficiency
Acta Paediat. Scand. 59, 659, 1970
5. Fischer, W., H. Weinland
Stoffwechsel der Galaktose und ihrer Derivate
Gg. Thieme Verlag, Stuttgart, 1965
6. Gesche, M., F. Menne,
Quantitative enzymatische Bestimmung der Galaktokinase-
aktivität im Erythrozytenhämolysat
Z. Klin. Chem. u. Biochem. 10, 430, 1972
7. Gitzelmann, R.
Deficiency of Erythrocyte Galaktokinase in a Patient
with Galaktose Diabetes
Lancet 1965/ II, 670
8. Gitzelmann, R.
Hereditary Galactokinase Deficiency, a newly recognized
Cause of Juvenile Cataracts
Pediat. Res., 1, 14, 1967
9. Gitzelmann, R.
Inability of Galactose to mobilize Insulin in Galacto-
kinase-Deficient Individuals
Diabetolog. 5, 143, 1969
10. Gitzelmann, R.
Deficiency of Uridine Diphosphate Galactose-4-Epimerase
in Blood Cells of an apparently Healthy Infant
Helv. paediat. Acta, 27, 125, 1972

11. Guthrie, R.
Glucose supplementation method for confirmation of inhibitory substances as galactose in galactosemia test
Progress Report, July 1966
Zit. bei Thalhammer 29.
12. Hansen, R. G.
Hereditary Galactosemia
J. Am. Med. Ass., 208, 43, 1969
13. Kalckar, H. M., E. P. Anderson, K. J. Isselbacher
Galactosemia; a congenital defect in an nucleotide transferase
Biochem. Biophys. Acta, 20, 262, 1956
14. Kaloud, H., F. C. Sitzmann
Zur akuten Form der Galaktosämie bei Geschwistern
Mschr. Kinderheilk., 118, 424, 1970
15. Kaloud, H., F. C. Sitzmann
Ergebnisse klinischer und biochemischer Untersuchungen bei einer Sippe mit Erkrankung an Galaktosämie
Beiheft Archiv Kinderheilk. Nr. 64
Enke Verlag, Stuttgart, 1971
16. Kaloud, H., F. C. Sitzmann, R. Mayer, F. Paltauf
Klinische und Biochemische Befunde bei einem Kleinkind mit hereditärem Galaktokinasedefekt
Klin. Pädiat. 184, 1973, im Druck
17. Kerr, M. M., R. W. Logan
Galactokinase Deficiency in a newborn infant
Arch. Dis. Childh. 46, 864, 1971
18. Kraus, H., E. Mönch
Enzymatische Methoden zur Diagnose der Galaktosämie und des Galaktokinase mangels
Klin. Wschr. 48, 437, 1970
19. Leloir, L. F.
The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose-derivate
Arch. Biochem., 33, 186, 1951
20. Leuthardt, F.
Lehrbuch der physiologischen Chemie
de Gruyter Verlag, Berlin, 1963

21. Linneweh, F., E. Schaumlöffel, M. Vetrelle
Galaktokinasedefekt bei einem Neugeborenen
Klin. Wschr. 48, 31, 1970
22. Mayes, J.S., R. Guthrie
Detection of Heterozygotes for Galactokinase Deficiency
in a Human Population
Biochem. Genet. 2, 219, 1968
23. Monteleone, J.A.
Cataracts, Galactosuria and Hypergalactosemia due to Galactokinase Deficiency in a Child
Am. J. Med. 50, 401, 1971
24. Ng, W.G., G.N. Donnell, W.R. Gergren
Galactokinase activity in human erythrocytes of individuals at different ages
J. Lab. Clin. Med. 66, 115, 1965
25. Pickering, W.R., R.R. Howell
Galaktokinase-deficiency: clinical and biochemical findings in a new kindred
J. Ped. 81, 50, 1972
26. Reuss, A.V.
Zuckerausscheidung im Säuglingsalter
Wien. med. Wschr. 58, 799, 1908
27. Scheibenreiter, S., O. Thalhammer
Galaktosämie meist foudroyant verlaufend
Wien. klin. Wschr. 84, 93, 1972
28. Tedesco, T.A., W.J. Mellman
Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase and Galactokinase Activity in Cultured Human Diploid Fibroblasts and peripheral Leucocytes
J. Clin. Invest. 48, 2390, 1969
29. Thalhammer, O., R. Gitzelmann, M. Pantlitschko
Hypergalactosemia and Galactosuria due to Galactokinase Deficiency in a Newborn
Pediatrics, 42, 441, 1968
30. Vigneron, C.C., C. Marchal, M. Deifts, M. Vidailhet, N. Neimann
Deficit partial et transitoire en galaktokinase erythrocytaire chez un nouveau-ne
Arch. fran. Pediat. 27, 523, 1970

Lebenslauf

Ich wurde am 6.4.40 in Schankau, Kreis Karlsbad, als viertes und letztes Kind des Beamten Lothar Müller und seiner Frau Anna geboren.

Die Volksschule besuchte ich bis zur sechsten Klasse in Hohenmölsen, Kreis Weißenfels a.d.Saale. Danach wechselte ich in die Oberrealschule in Schwandorf i.Bay. über, wo ich 1962 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1962/63 begann ich an der Universität in Erlangen Medizin zu studieren. Im Februar 1969 bestand ich das medizinische Staatsexamen. Die Medizinalassistentenzeit leistete ich im Krankenhaus Schwandorf ab. Die Approbation erhielt ich im Frühjahr 1970. Als Assistenzarzt blieb ich auf der chirurgischen Abteilung in Schwandorf. Im April 1971 wurde ich als Stabsarzt zur Bundeswehr eingezogen und im September 1972 aus der Bundeswehr entlassen.

Seitdem habe ich bis zum jetzigen Zeitpunkt an dieser Dissertation gearbeitet.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990